



**FutureFor
Coppices**

Shaping future forestry for sustainable coppices in southern Europe:
the legacy of past management trials



Criterio 2 – Mantenimento della salute e vitalità delle foreste

Indicatori di Gestione Forestale Sostenibile

Manuale

Misura della fluorescenza della clorofilla *a*, contenuto di clorofilla e tratti fogliari: campionamento, raccolta e misurazioni.

Guida per studi in campo.

Novembre 2016

Forma raccomandata di citazione:

Gottardini E., Cristofolini F., Cristofori A., Pollastrini M., Ferretti M., 2016. Misura della fluorescenza della clorofilla *a*, contenuto di clorofilla e tratti fogliari: campionamento, raccolta e misurazioni. Guida per studi in campo. Documento del progetto LIFE FutureForCoppiceS, Azione B.2, pp. 34.

SOMMARIO

Extended abstract.....	5
Riassunto esteso	6
1. Introduzione	7
2. Scopi ed applicazione	8
3. Obiettivi	9
4. Localizzazione delle misurazioni e campionamento	9
4.1 Prelievo del campione di foglie dagli alberi selezionati.....	10
4.2 Preparazione dei sub-campioni di foglie da misurare.....	11
5. Misurazioni e osservazioni	12
5.1 Fasi di lavoro.....	12
5.2 Variabili	16
5.2.1 Contenuto di clorofilla.....	17
5.2.2 Fluorescenza della clorofilla a.....	17
5.2.3 Variabili di morfologia fogliare	18
5.3 Procedure di Assicurazione di Qualità (QA)	23
6. Gestione ed analisi dei dati	24
7. Interpretazione dei dati	25
8. Bibliografia ed ulteriori letture	26
9. Annessi	28

Extended abstract

This Manual describes the procedures to obtain data on “new” indicators to be applied in order to evaluate tree health and growth under a functional key. “New” indicators comprise variables used in different experiments and in studies, but not yet routinely applied in forest ecosystem monitoring. They are intended to integrate and support the consolidated indicators under the Criterion 2 of Sustainable Forest Management (SFM, Criterion 2: Maintenance of Forest Ecosystem Health and Vitality; Forest Europe, UNECE e FAO 2011).

The suggested new indicators, which retain an explicit ecophysiological value, provide information on forest health and vitality by measurable attributes and processes like photosynthetic efficiency of plants and their adaptation to the environment. Specifically, the indicators here considered are: (i) leaf chlorophyll content, (ii) chlorophyll *a* fluorescence and (iii) leaf morphology.

Operative procedures described in this Manual cover all working stages to be addressed for the correct use of the proposed indicators, from understanding of their ecophysiological meanings to the analysis of collected data.

A key element is to ensure the Quality Assurance (QA) of the process in order to obtain reliable and repeatable results. That is the aim of the Manual, where, for each stage, a set of operating procedures suitable to achieve the purpose of the measures is described.

As a first step the sampling design is described, so that the sample can be regarded as representative for the target population. The second step is the implementation of measurements of the considered variables, i.e. the description of the method used to collect the data for each of the proposed indicators.

Finally, a description of the most suitable methodologies for data storage, analysis and interpretation is provided.

The most relevant bibliographic references are listed.

Riassunto esteso

Il presente Manuale descrive le procedure per ottenere dati relativi a “nuovi” indicatori per valutare lo stato di salute e vitalità degli alberi in chiave funzionale. Per “nuovi” indicatori si intendono variabili già usate in studi sullo stato fisiologico delle piante e delle loro risposte all’ambiente, , ma non ancora regolarmente applicate nel monitoraggio degli ecosistemi forestali. Essi sono intesi ad integrazione e supporto a quelli ormai consolidati nell’ambito del Criterio 2 di Gestione Forestale Sostenibile (GSF, C2: Mantenimento della salute e vitalità degli ecosistemi forestali (Forest Europe, UNECE e FAO 2011).

Gli indicatori proposti, di tipo quantitativo e con esplicito significato ecofisiologico, forniscono informazioni sulla salute e vitalità delle foreste attraverso attributi e processi misurabili e riguardanti l’efficienza fotosintetica delle piante e loro adattamento all’ambiente. Nello specifico gli indicatori qui considerati sono i seguenti: (i) contenuto fogliare di clorofilla, (ii) fluorescenza della clorofilla *a* e (iii) variabili di morfologia fogliare.

Le procedure operative descritte nel manuale riguardano tutte le fasi di lavoro da affrontare per un corretto utilizzo degli indicatori proposti, dalla comprensione dei rispettivi significati ecofisiologici fino all’analisi dei dati raccolti.

Un elemento di primaria importanza è l’assicurazione di qualità (QA) per il processo seguito, in modo da garantire risultati attendibili e ripetibili. Proprio a questo scopo viene creato il presente manuale operativo, in cui per ciascuna fase è possibile seguire una serie di procedure operative adatte al raggiungimento dello scopo delle misure.

Come primo aspetto viene descritta la modalità di campionamento, affinché il campione raccolto possa essere considerato rappresentativo della popolazione statistica considerata. Il secondo passaggio descritto è quello dell’attuazione delle misure delle variabili considerate, ovvero la descrizione del metodo utilizzato per eseguire la raccolta dei dati per ciascuno degli indicatori proposti.

Il manuale si conclude con una descrizione delle metodologie più adatte per l’archiviazione, l’analisi e l’interpretazione dei dati raccolti.

Vengono forniti, per ciascuna fase, i riferimenti bibliografici più rilevanti per permettere l’approfondimento e la verifica delle fonti delle informazioni fornite.

1. Introduzione

Lo stato di salute e vitalità dell'ecosistema foresta viene solitamente stimato attraverso la valutazione visiva delle condizioni delle chiome degli alberi (Ferretti and Fisher 2013). La defogliazione, definita come la ridotta densità di foglie su un albero in confronto ad uno standard di riferimento, è l'indicatore più frequentemente e diffusamente usato a tale scopo (Eichhorn and Roskams 2013). La valutazione della defogliazione rappresenta un valido sistema per registrare le risposte dell'ecosistema a variazioni di diversi fattori quali condizioni climatiche, deposizioni di inquinanti, infestazioni di funghi e insetti. Ciò nonostante, tale attributo è stato spesso criticato per la sua genericità e per la relazione non chiara con lo stato fisiologico della pianta; è stata inoltre evidenziata la necessità di disporre di indicatori di salute maggiormente obiettivi e quantificabili. Con il presente manuale si propone l'uso di "nuovi" indicatori e si descrivono le procedure per ottenerne i relativi dati al fine di valutare lo stato di salute e vitalità degli alberi in chiave funzionale. Per "nuovi" indicatori si intendono variabili già testate, ma non ancora regolarmente utilizzate nel monitoraggio degli ecosistemi forestali. Essi sono intesi ad integrazione di quelli consolidati nell'ambito del Criterio 2 di Gestione Forestale Sostenibile (GFS, C2: Mantenimento della salute e vitalità degli ecosistemi forestali; Forest Europe, UNECE e FAO 2011).

Gli indicatori descritti, di tipo quantitativo e con un potenziale informativo di tipo ecofisiologico, forniscono informazioni sull'efficienza fotosintetica delle piante e sul loro adattamento all'ambiente. Essi consistono in: (i) contenuto fogliare di clorofilla, (ii) fluorescenza della clorofilla *a* e (iii) variabili di morfologia fogliare.

I dati ottenuti attraverso la misura degli indicatori proposti servono a supportare e rafforzare il collegamento tra lo stato delle chiome e la funzionalità e vitalità degli ecosistemi forestali.

La metodologia descritta in questo Manuale si basa sull'esperienza maturata nell'ambito del progetto LIFE FutureForCoppices (<http://www.futureforcoppices.eu/en/>). Obiettivo del progetto è la valutazione, attraverso l'uso di indicatori consolidati di GFS e nuovi indicatori funzionali, dell'esito, in termini di sostenibilità, di differenti trattamenti selvicolturali applicati a boschi cedui di faggio, leccio e cerro.

Si ritiene che gli indicatori e i metodi qui riportati possano però avere una valenza più ampia e trovare ulteriori applicazioni in ambiente forestale, integrando la valutazione visiva delle chiome con informazioni specie-specifiche sulle condizioni ecofisiologiche della pianta (Bussotti and Pollastrini 2015; Gottardini et al. 2016; Pollastrini et al. 2014, 2016a, 2017).

2. Scopi ed applicazione

Questo manuale ha lo scopo di fornire una metodologia per la raccolta di campioni fogliari e per le misure di tratti fogliari al fine di ottenere dati di elevata qualità, affidabili e comparabili, sullo stato di vitalità degli alberi in bosco e sul loro adattamento all'ambiente.

Le procedure descritte nel presente manuale sono state sviluppate per essere applicate in ambienti forestali. In tale contesto, l'utilizzo di nuovi indicatori ha lo scopo di fornire dati utili per dimostrare l'effettivo valore (potenziale informativo) degli indicatori consolidati di salute delle foreste del Criterio 2 in relazione a dati ecofisiologici quantitativi, misurati ed oggettivi, sulla funzionalità e vitalità dell'ecosistema foresta.

In Tabella 1 sono riportate le variabili proposte e la collocazione degli specifici paragrafi nel capitolo 5 del manuale (Misurazioni e osservazioni).

Tab. 1 – Variabili, unità di misura e collocazione nel manuale delle specifiche spiegazioni del metodo.

Variabile	Unità di misura	Paragrafo
Contenuto di clorofilla	unità arbitraria	5.2.1
Fluorescenza della clorofilla a	unità arbitrarie	5.2.2
Variabili di morfologia fogliare	mm; mm ² ; mg; mm ² /mg	5.2.3

3. Obiettivi

L'obiettivo principale dell'indagine è stimare con un livello di incertezza accettabile lo stato di salute e vitalità delle piante attraverso la misura di indicatori innovativi per il contesto GFS.

Ad oggi non vi sono informazioni di riferimento sugli errori statistici accettabili per tali tipologie di misurazioni effettuate in ambiente di foresta. Analisi preliminari condotte in contesto alpino su $n=9$ piante adulte di abete rosso (Gottardini et al. 2016) suggeriscono che un numero di osservazioni per pianta compreso tra 1 e 10 (media = 5) è sufficiente per ottenere valori medi di F_0 (valore minimo di fluorescenza della clorofilla a emessa da un campione fogliare adattato al buio; vedi par. 5.2) con un intervallo di confidenza pari al 10% della media stessa, ad una probabilità del 95% (deviazione standard = 11% della media). A titolo di esempio, in Tabella 2 si riporta il numero medio di osservazioni da effettuare per pianta in relazione a deviazione standard ed ampiezza di intervallo di confidenza basandosi su valori medi di F_0 del citato studio.

Tab. 2 – Numero medio di osservazioni (foglie) da effettuare per pianta adulta di abete rosso, in relazione a deviazione standard e intervallo di confidenza per valori di F_0 .

Ampiezza intervallo di confidenza, %	Deviazione standard, %					
	5	10	15	20	25	30
1	96	384	864	1537	2401	3457
5	4	15	35	61	96	138
10	1	4	9	15	24	35
15	0	2	4	7	11	15
20	0	1	2	4	6	9
25	0	1	1	2	4	6

4. Localizzazione delle misurazioni e campionamento

Le misurazioni degli indicatori proposti sono svolte su campioni di foglie raccolte dalla chioma di alberi nel periodo vegetativo compreso tra giugno e settembre, quando le foglie sono completamente sviluppate. La prima questione da affrontare riguarda la selezione delle piante dalla popolazione interessata dallo studio. L'identificazione di tale popolazione è quindi il primo passo per definire correttamente l'intera strategia di campionamento. Tale definizione è ovviamente dipendente dall'ambito in cui si svolge l'indagine.

Nel progetto Life FutureForCoppiceS la popolazione di riferimento era costituita dagli alberi con diametro superiore o uguale a 10 cm presenti all'interno di ciascuna area del progetto e selezionati mediante un macroplot disposto casualmente al suo interno (Figura 1) (Ferretti et al., 2016). La selezione dei singoli alberi si è basata sull'esito della valutazione dello stato delle chiome (indicatori tradizionali del Criterio 2 di GFS) condotta su tutti gli alberi del macroplot, considerando tutte le piante dominanti della specie prevalente con diametro ≥ 10 cm presenti nella *core area* e quelle con diametro ≥ 40 cm nella *buffer zone* (Figura 1).

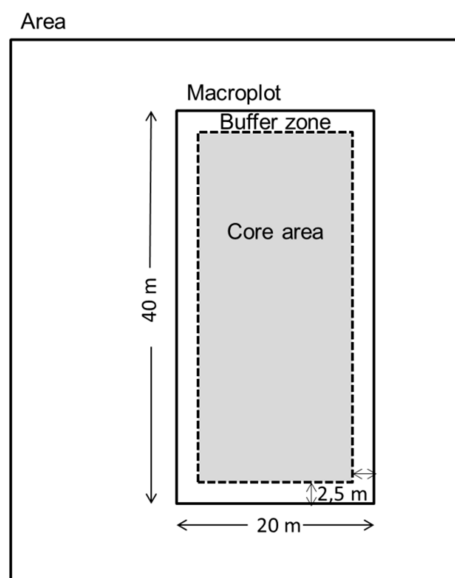


Fig. 1 – Schema della struttura del macroplot definita per il progetto Life FutureForCoppiceS.

Una volta disponibile la lista degli alberi e la loro valutazione di defogliazione/trasparenza, gli alberi sono stati assegnati a tre gruppi (strati) in base al valore di defogliazione:

- piante con defogliazione bassa: $\leq 10\%$
- piante con defogliazione media: $>10\%-25\%$
- piante con defogliazione alta: $>25\%$

Si è dunque calcolata la numerosità di ciascun gruppo e, mediante estrazione casuale [ad es. usando la funzione di Microsoft Excel “=casuale.tra (1; n)”, dove n = numero di piante del gruppo], è stato individuato un albero per ogni categoria di defogliazione (strato) (oltre a possibili sostituzioni) dal quale è stato prelevato il campione di foglie. Pur tenendo conto dell'importanza della rappresentatività di ciò che viene misurato, la numerosità degli alberi e dei campioni deve essere valutata anche in funzione delle risorse disponibili.

4.1 Prelievo del campione di foglie dagli alberi selezionati

Questa seconda fase riguarda il prelievo del campione dall'albero. A tale scopo per ciascuna pianta si definisce in modo casuale un'esposizione della chioma (espressa in gradi) dalla quale viene prelevato il campione (=ramo). Il ramo deve trovarsi in posizione di luce, nella parte superiore della chioma; in questo modo il campione è inteso provenire da una situazione di massima potenzialità di attività fotosintetica. Dipendentemente dall'altezza della pianta selezionata, il campione può essere prelevato da terra con sveltatoio o avvalendosi di tree climbers (Figura 2). Nel secondo caso, gli aspetti tecnici della salita sul tronco per raggiungere la parte sommitale della pianta possono comportare la necessità di scartare piante casualmente selezionate a causa dell'impossibilità di svolgere in sicurezza il lavoro di arrampicata. In tal caso si procede alla sostituzione della pianta selezionata, considerando la prima di quelle precedentemente individuate con selezione casuale appartenente alla stessa classe di defogliazione.



Fig. 2 – Fasi di lavoro per la raccolta dei campioni di foglie nel macroplot.

Da ciascun albero, all'esposizione definita casualmente e verificata da un secondo operatore a terra dotato di bussola, viene tagliata la porzione distale di un ramo di circa 1m di lunghezza. Il ramo tagliato viene tempestivamente recuperato dall'operatore a terra. La lunghezza del ramo tagliato deve essere tale da garantire l'acquisizione di un campione di foglie sufficientemente numeroso (vedi par. 4.3).

Il campione viene frazionato in rametti lunghi circa 50 cm, riposto in sacchetti di plastica, etichettati con codice comprensivo di dati univoci per area, macroplot, albero. Si riportano inoltre data e ora di raccolta. Se si lavora in condizioni di temperature elevate, con conseguente rischio di disidratazione dei campioni, si suggerisce di avvolgere le estremità recise dei rametti con carta assorbente bagnata con acqua per ridurre la disidratazione del campione e di riporre il sacchetto con il campione in una borsa termica con mattonelle refrigeranti (Figura 3).

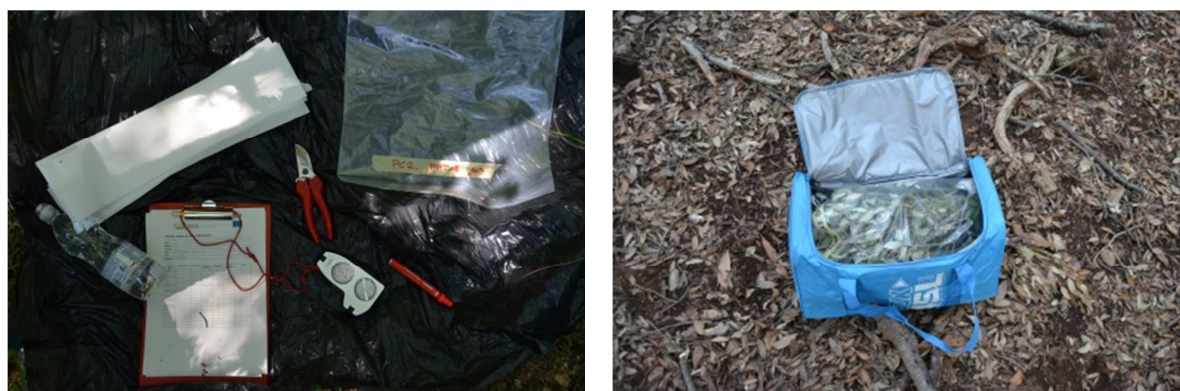


Fig. 3 – Materiale occorrente in fase di raccolta dei campioni di foglie nel macroplot.

4.2 Preparazione dei sub-campioni di foglie da misurare

Prima di procedere alle misurazioni delle diverse variabili (fluorescenza della clorofilla, contenuto di clorofilla, variabili di morfologia fogliare), occorre predisporre i sub-campioni di foglie. Rispettando l'ordine temporale di

raccolta dagli alberi, si procede togliendo manualmente tutte le foglie completamente sviluppate - piccolo compreso - presenti sui rametti. Le foglie staccate sono poste in un sacchetto di plastica etichettato con il codice del campione (sito-area-macroplo-plot-pianta).

Dall'insieme delle foglie staccate, opportunamente mescolate, si estrae casualmente:

- (i) un sub-campione di 100 foglie per la determinazione del peso secco. Questo sub-campione viene posto in un sacchetto di carta con riportato il codice del campione e mantenuto in luogo ventilato fino al momento dell'essecuzione in stufa (vedi par. 5.2.3).
- (ii) un sub-campione di 15 foglie per le misure di contenuto di clorofilla, fluorescenza della clorofilla e delle variabili di morfologia fogliare. Le 15 foglie estratte casualmente sono valutate visivamente per verificare se abbiano i requisiti necessari richiesti dal tipo di misure da effettuare: (a) la lamina fogliare deve presentare una porzione integra sufficiente per poter misurare il contenuto di clorofilla (vedi par. 5.2.1) e per posizionare la clip per l'adattamento al buio, necessario per effettuare la misura della fluorescenza della clorofilla (vedi par. 5.2.2); (b) la lamina fogliare deve essere sufficientemente integra per poter consentirne la misura della massima larghezza e lunghezza (vedi par. 5.2.3), ovvero non devono mancare porzioni nella parte più larga della foglia e all'apice e base della lamina fogliare. Le foglie che non soddisfano i requisiti (a) e (b), vengono sostituite estraendo nuove foglie dal campione complessivo. Il numero di foglie scartate viene tuttavia annotato in quanto può contribuire a dare indicazioni sulle effettive condizioni del fogliame stesso.





5. Misurazioni e osservazioni

5.1 Fasi di lavoro



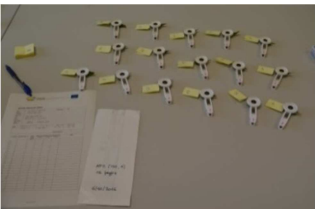





Per eseguire le misure è necessario disporre, possibilmente nei pressi dell'area di raccolta, di un locale attrezzato con corrente elettrica e un ampio piano di lavoro. Il campione viene analizzato tra le 4 e le 24 ore successive alla raccolta. La descrizione delle procedure di seguito riportata si basa su un'esperienza di lavoro svolta da un team composto da 3 (4) operatori ben addestrati.

In Tabella 3 si descrivono le fasi di lavoro secondo la sequenza adottata per la realizzazione delle misure degli indicatori fogliari considerati. Sebbene tali misure non siano distruttive e pertanto la sequenza non sia da considerarsi vincolante, quanto suggerito sembra essere la procedura più favorevole per ottimizzare i tempi di lavoro e il numero di operatori coinvolti.

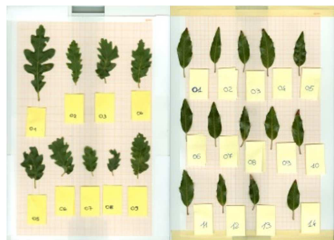

Tab. 3 – Fasi di lavoro per la raccolta dei campioni fogliari e misure degli indicatori descritte in sequenza di realizzazione. Per ogni fase sono riportata un'immagine esplicativa ed una stima del tempo impiegato da una squadra di 3 (4) operatori, più i tree climbers (2-3) impiegati in fase di raccolta dei campioni dagli alberi. (→ Continua nelle pagine seguenti).

	Sequenza di lavoro	Immagini	Tempi (minuti/albero)
In campo	<p>Individuazione dell'albero (cap. 4)</p> <p>Si valuta in campo se è possibile prelevare il campione di foglie dall'albero selezionato avvalendosi delle competenze di tree climbers.</p>		Variabili in base alla logistica dell'area di indagine
	<p>Prelievo del campione (par. 4.1)</p> <p>La raccolta del campione deve essere seguita da un referente del gruppo di lavoro per supportare i tree climbers e procedere alla tempestiva preparazione del campione</p>		60-90
	<p>Preparazione del campione in campo (par. 4.1)</p> <p>Il campione prelevato da ogni albero viene imbustato riportando codici identificativi ed adottando accorgimenti per la conservazione</p>	 	10

Tab. 3 – (→ Continua nelle pagine seguenti).

	Sequenza di lavoro	Immagini	Tempi (minuti/albero)
In loco	<p>Preparazione del sub-campione di foglie da misurare (par. 4.2)</p> <p>Si analizzano i campioni rispettando l'ordine di raccolta. Tutte le foglie sono poste in un sacchetto di plastica etichettato con il codice del campione. Dal campione complessivo di foglie, opportunamente mescolato, si estrae casualmente: (i) un sub-campione di 15 foglie per misure strumentali, (ii) un sub-campione di 100 foglie per il peso secco (par. 5.2).</p>	 	20-30
	<p>Fluorescenza della clorofilla a (par. 5.2.2)</p> <p>Su ciascuna delle 15 foglie si posiziona una clip. Le clip chiuse agiscono per 20 minuti prima della misura. Trascorsi i 20 minuti si acquisisce la misura utilizzando il fluorimetro Handy-PEA. Si suggerisce di nominare i file con il codice identificativo della foglia.</p>	  	15-25
	<p>Contenuto di clorofilla (par. 5.2.1)</p> <p>Rimossa la clip da ciascuna foglia del sub-campione si misura il contenuto di clorofilla utilizzando il misuratore del contenuto di clorofilla SPAD. Ogni foglia è etichettata con codice identificativo univoco identico al nome del file archiviato sul fluorimetro ed annotato sulla scheda cartacea (Annesso 2).</p>		
	<p>Variabili di morfologia fogliare (par. 5.2.3)</p> <p>In una prima fase si misura lo spessore di ogni foglia utilizzando un calibro digitale di precisione. Ogni misura è annotata sulla scheda cartacea</p> <p>Si procede a scansionare la pagina superiore di tutte le foglie per consentire l'acquisizione di immagini che possano essere analizzate in un secondo momento per le ulteriori misure morfometriche.</p>	 	

Tab. 3 – (→ Continua dalle pagine precedenti).

	Sequenza di lavoro	Immagini	Tempi (minuti/albero)
In ufficio	<p>Variabili di morfologia fogliare (par. 5.2.3)</p> <p>Utilizzando le immagini acquisite si procede alla valutazione per ciascuna foglia dei parametri previsti.</p>		70-90
In laboratorio	<p>Variabili di morfologia fogliare (par. 5.2.3)</p> <p>Misura del peso secco: le foglie del sub-campione (ii) sono pesate e posizionate in stufa termostata a 60°-70°C per 72 ore. Si controlla il peso ogni giorno; quando la riduzione di peso si stabilizza e non si registrano più variazioni, si considera il campione completamente disidratato e si riporta il peso finale raggiunto su scheda cartacea (Annesso 3).</p>		15

5.2 Variabili

In Tabella 4 sono elencate le variabili proposte, le abbreviazioni, il metodo e/o lo strumento utilizzato per ottenere i dati e le relative unità di misura.

Tab. 4 – Variabili, abbreviazione, metodo e/o strumento utilizzato e unità di misura.

Variabile	Abbreviazione	Metodo, strumento	Unità di misura
Contenuto di clorofilla	Chl _{SPAD}	Misuratore di contenuto di clorofilla SPAD-502DL Plus, Minolta USA	unità arbitraria
Fluorescenza della clorofilla a:	ChlaF	Fluorimetro Handy-Pea (Hansatech Instruments, Pentney, Norfolk, UK)	unità arbitrarie
• fluorescenza iniziale di un campione adattato al buio	F_0		
• fluorescenza massima di un campione adattato al buio	F_M		
• massima resa della fotochimica primaria del PSII	F_v/F_M		
• $V_J = (F_J - F_0)/(F_M - F_0)$. Fluorescenza variabile relativa al tempo $t=2$ ms (punto J)	V_J		
• $V_I = (F_I - F_0)/(F_M - F_0)$. Fluorescenza variabile relativa al tempo $t=30$ ms (punto I).	V_I		
• $PI_{abs} = [1 - (F_0/F_M)]/[M_0/V_J] * [(F_M - F_0)/F_0] * [(1 - V_J)/V_J]^1$	PI_{abs}		
Morfologia fogliare			
• area foglia	LA	Analisi dell'immagine, software ImageJ	mm ²
• lunghezza foglia	LL		mm
• lunghezza lamina	LaL		mm
• larghezza lamina	LaW		mm
• larghezza max. parte destra lamina	RW		mm
• larghezza max. parte sinistra lamina	LW		mm
• spessore lamina	LT	Calibro digitale Baxlo [®] , modello 3000DIG	mm
• asimmetria fluttuante	FA	$2 * WL - WR / (WL + WR)$	
• area specifica fogliare	SLA	=LA/DW	mm ² /mg
• peso secco	DW	Stufa a 60-70°C per 72 h (o fino al raggiungimento di peso costante)	mg

¹ $M_0 \equiv (\Delta V/\Delta t)_0 = 4(F_{300\mu s} - F_0)/(F_M - F_0)$ - pendenza iniziale, calcolata rispetto a F_{300} (in ms⁻¹) del transient di fluorescenza normalizzato sulla fluorescenza variabile $V = f(t)$ (tratto da: Bussotti et al., 2012b).

5.2.1 Contenuto di clorofilla

Significato

Il contenuto di pigmenti fotosintetici di una foglia può essere alterato da fattori biotici e abiotici di stress; la misura di questa variabile può quindi fornire informazioni sullo stato di vitalità della pianta.

Metodo

Il contenuto di clorofilla può essere misurato *in vivo* utilizzando un misuratore di contenuto di clorofilla (SPAD-502DL Plus, Minolta USA); il metodo non comporta la distruzione della foglia misurata. Su ciascuna delle 15 foglie che compongono il sub-campione (ii) (come indicato al par. 4.2), si eseguono tre misure in altrettanti punti casuali della lamina; lo strumento fornisce quindi il valore medio, che viene trascritto su scheda cartacea (vedi Annesso 2).

5.2.2 Fluorescenza della clorofilla *a*

Significato

La fluorescenza della clorofilla *a* è la luce emessa da un organismo fotosintetico quando illuminato con radiazione compresa tra 400-700 nm in seguito all'eccitazione della clorofilla *a* contenuta nei fotosistemi. L'intensità con cui la fluorescenza è emessa è inversamente proporzionale alla quantità di radiazione solare utilizzata per la fotosintesi. Per questo motivo l'analisi della fluorescenza della clorofilla *a* è una delle tecniche ecofisiologiche largamente usata per stimare le variazioni indotte da fattori di stress nell'efficienza fotosintetica delle piante (Maxwell and Johnson 2000, Murchie and Lawson 2013, Guidi and Calatayud 2014; Kalaji et al. 2016). Per ulteriori approfondimenti sull'argomento si rimanda a Strasser et al. 2000, Papageorgiou and Govindjee 2004, Bussotti et al. 2012b, Pollastrini et al. 2016b).

Metodo

La procedura descritta si riferisce a misure effettuate con il fluorimetro Handy-Pea (H-PEA, Hansatech Instruments, Pentney, Norfolk, UK), che fornisce dati sul transient di emissione fluorescenza indotta (Figura 4). Su un punto casuale della lamina fogliare di ciascuna delle 15 foglie del sub-campione (ii) (come riportato in 4.2) si posiziona una clip oscurante, prestando attenzione che il lumen della clip (4 mm² di superficie) sia completamente occupato dalla lamina fogliare. Le clip vengono mantenute chiuse per almeno 20 minuti prima della misura, per consentire al campione fotosintetico di adattarsi al buio. Trascorsi i 20 minuti si procede ad acquisire la misura con il fluorimetro H-PEA.

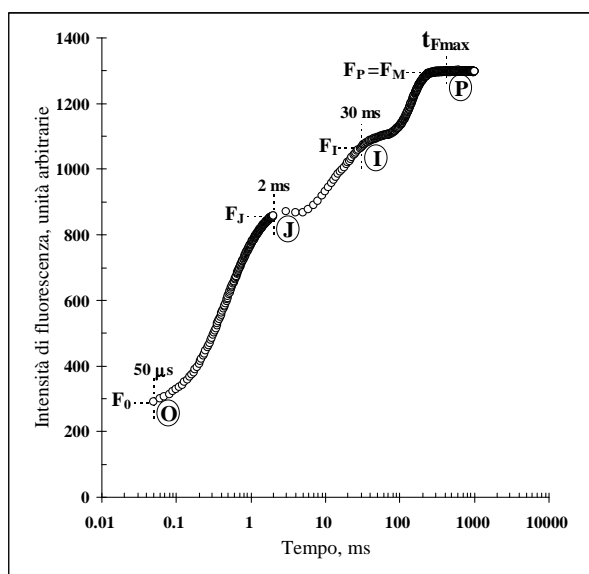


Fig. 4 – Transient di fluorescenza della clorofilla a emessa da un campione adattato al buio e sottoposto a un flash di luce attinica saturante (intensità di $3500 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$).

5.2.3 Variabili di morfologia fogliare

Significato

La morfologia fogliare è descritta da una serie di attributi, i quali sono influenzati da particolari condizioni ambientali (ad es. temperatura, disponibilità idrica, intensità di luce), fattori allometrici (ad es. dimensione della pianta, architettura della chioma), dalla fenologia (ad es. età della foglia) e altri fattori di stress (Cornelissen et al. 2003). I parametri di morfologia fogliare sono indicatori ecologici importanti 'per se', poiché molti fattori di stress riducono la crescita sia di singoli organi, sia dell'intera pianta e dunque la sua produttività.

I seguenti parametri di morfologia fogliare possono essere usati come indicatori di vitalità e stato di salute della pianta:

Area della foglia (leaf area, LA)

L'area di una foglia è l'area della superficie della foglia proiettata su un piano orizzontale ed è la più comune metrica per la dimensione della foglia stessa. LA influenza il bilancio energetico e idrico della foglia e quindi della chioma di una pianta. Variazioni interspecifiche in LA sono state associate a variazioni climatiche, geologiche, altitudinali e latitudinali. Fattori di stress ambientali quali la carenza idrica, elevata intensità di radiazione solare, alte e basse temperature e carenze nutrizionali riducono LA. Variazioni di LA possono essere legate anche alla dimensione della pianta e dei rametti, all'architettura della chioma, al numero di foglie nella chioma e alla presenza di getti laterali.

Lunghezza foglia (leaf length, LL)

La lunghezza della foglia è la lunghezza della lamina compreso il picciolo. Insieme a LA, LL è il parametro comunemente usato per misurare la dimensione della foglia. LL e LA sono strettamente associati e influenzati dagli stessi fattori ambientali.

Lunghezza lamina (lamina length, LaL)

Il significato biologico ed ecologico della lunghezza della lamina è analogo a quello di LL. Esprime la dimensione della lamina fogliare, quindi della superficie fotosintetizzante (considerando la foglia unità di superficie fotosintetizzante della chioma). LaL fornisce indicazioni sull'esplorazione ed occupazione dello spazio da parte della pianta per avere un'efficiente intercettazione della luce, assorbimento di CO₂ e per ridurre la traspirazione. LaL è influenzata dai fattori ambientali di stress discussi per LA. Inoltre anche insetti, sia defogliatori sia galligeni, funghi e animali erbivori possono modificare, con la loro azione trofica e patogena, LaL. Una riduzione di LaL può essere dovuta anche a danni meccanici sulla foglia provocati da vento e grandine.

Larghezza lamina (lamina width, LaW)

La larghezza della lamina fogliare è la misura della massima larghezza della foglia ed è un parametro in relazione con LA. Foglie strette o foglie lobate con lobi stretti tendono ad avere un minore strato limite con l'atmosfera e una maggiore perdita di calore rispetto a foglie larghe a parità di area fogliare. Questo è considerato una risposta adattativa delle piante in climi caldi e ambienti con elevata irradiazione. LaW contribuisce positivamente e, in misura maggiore rispetto a LA, alla dominanza della chioma di una pianta nel piano della copertura forestale. Tra i fattori ambientali, l'esposizione alla luce influenza maggiormente LaW.

Asimmetria fluttuante (fluctuating asymmetry FA)

L'asimmetria fluttuante rappresenta piccole deviazioni, non direzionali, dalla perfetta simmetria in caratteri morfologici, tra cui LaW e LA. FA deriva dalla instabilità ecologica nella crescita di un organismo quando esposto a stress ambientali e genetici. In condizioni ideali, infatti, la pianta cresce in condizioni ecologiche ottimali. Se queste condizioni cambiano, allontanandosi dall'optimum, tratti morfologici e funzionali della pianta deviano dalla forma ideale. Le foglie sono strutture bilaterali e la loro perfetta simmetria è attesa in condizioni di crescita ottimali. Deviazioni dalla simmetria nella forma delle foglie sono descritte con la frequenza di distribuzione della larghezza della parte destra (RW) e larghezza della parte sinistra (LW), rispetto alla nervatura principale, della lamina fogliare. La maggiore larghezza della lamina può essere a destra o a sinistra in modo casuale (da qui il termine asimmetria fluttuante). FA è usato come indice di stress ambientali, tra cui siccità, carenza nutrizionale, inquinamento, attacco di insetti, competizione. Per approfondimenti sulla metodologia di misura di FA e sue applicazioni si rimanda a Palmer e Strobeck (1986) e a Graham et al. (2010).

Spessore lamina (lamina thickness, LT)

Lo spessore fogliare riflette il grado di acclimatazione all'elevata intensità di radiazione solare delle foglie (foglie esposte alla luce sono più spesse). Lo spessore fogliare determina la resistenza fisica delle foglie. LT è maggiore in foglie di piante cresciute in suoli siccitosi e poveri di nutrienti. In uno stesso individuo, le foglie di luce, quelle presenti nella parte periferica della chioma, e le foglie vecchie hanno un LT maggiore rispetto a foglie giovani e a foglie di ombra, presenti all'interno della chioma. La variazione di LT è determinata dal numero e spessore del mesofillo fogliare. LT, quindi, influenza il contenuto di azoto per unità di area fogliare.

Lo spessore della lamina fogliare fornisce indicazioni sulla quantità di carbonio investito in strutture di protezione dei tessuti vegetali: foglie fisicamente resistenti sono meglio protette da agenti di danno meccanico e di stress di tipo abiotico, tra cui vento, grandine, attacco di erbivori, contribuendo alla durata temporale (mesi, anni) delle foglie.

Peso secco (dry weight, DW)

Il peso secco della foglia è il peso di una foglia disidratata. DW è una misura di quanta massa fogliare è stata prodotta e convertita in tessuti fotosintetici. Similmente al contenuto di massa secca delle foglie (leaf dry matter content), DW è usato come indice di utilizzo delle risorse da parte della pianta nell'analisi dei tratti funzionali.

Area specifica fogliare (specific leaf area, SLA)

SLA è il rapporto tra l'area della lamina superiore (o inferiore) di una foglia e il suo peso secco ($SLA = LA/DW$) e rappresenta l'investimento di carbonio per unità di area fogliare. Questo parametro è spesso usato nell'analisi del tasso di crescita delle piante legnose perché è positivamente correlato con il tasso potenziale di crescita (relative growth rate) delle specie arboree. SLA è, inoltre, positivamente correlato con il tasso di fotosintesi e con il contenuto di azoto nelle foglie; è negativamente correlato con la longevità delle foglie e con la quantità di carbonio investito in composti secondari, come tannini e lignina. In genere, le specie vegetali che crescono in ambienti ricchi di nutrienti, hanno valori di SLA maggiori rispetto a quelli di specie che crescono in ambienti sfavorevoli. SLA è funzione del contenuto di massa secca fogliare e dello spessore della lamina. Entrambi questi parametri possono contribuire a SLA in modo diverso a seconda del tipo di habitat in cui la pianta vive. Per ulteriori approfondimenti sul significato ecologico dell'area specifica fogliare e dei tratti fogliari ad essa correlati si rimanda a Pérez-Harguindeguy et al. (2013).

Metodi

Al fine di effettuare le misure morfometriche, la pagina superiore di tutte le foglie del sub-campione (ii) ($n=15$) vengono scansionate per consentire l'acquisizione delle relative immagini (formato .jpeg; .tiff). I file vengono salvati con un nome che comprenda il codice univoco del campione. Le immagini possono quindi essere analizzate successivamente.

Per le misure lineari (LL, LaL, LaW, WR, WL) e della superficie (LA) è possibile utilizzare il programma *open source* "ImageJ" (Image J 1.50i, National Institute of Health, USA), con il quale si effettuano analisi di immagini (<http://imagej.net/ImageJ>).

L'immagine scansionata del sub-campione (15 foglie) viene visualizzata nel formato jpeg o .tiff in ImageJ. Prima di procedere con le misure lineari e/o di superficie, è necessario effettuare la calibrazione tra l'unità di misura espressa in pixel (di default in ImageJ) e l'unità prescelta (mm o cm). Per fare ciò si utilizza l'immagine di un righello o di un segmento di lunghezza nota tracciato su carta millimetrata. Si procede misurando il segmento di lunghezza nota. In questo modo il software registra la misura e permette di attribuire l'esatta corrispondenza tra i pixel e l'unità di misura prescelta. Successivamente si procede con l'aggiustamento delle soglie di colore dell'immagine in modo da avere uno sfondo dell'immagine di colore scuro e in modo che gli oggetti da misurare (le foglie) siano ben evidenti (ad esempio possiamo usare uno sfondo nero su cui le foglie verdi sono ben visibili). Per fare ciò si procede usando la funzione Image >

Adjust> Color Threshold. Questo ultimo comando consente di impostare i valori di soglia di colore dell'oggetto da misurare e dello sfondo. Per approfondimenti su ImageJ si rimanda a ImageJ User Guide, IJ 1.46r, Ferreira T., Rasband W. 2012.

Per la misura della lunghezza della foglia (LL) e della lunghezza della lamina (LaL) si traccia, rispettivamente, un segmento lineare dall'apice della lamina fino al picciolo o fino alla base della lamina (Figura 5A). Una volta tracciato il segmento si registra automaticamente il suo valore. Per la misura della larghezza massima della parte destra e sinistra della lamina, rispettivamente RW e LW, si traccia un segmento lineare perpendicolare alla nervatura principale, dalla nervatura stessa fino al margine della foglia (Figura 5B). Si procede, poi, con la registrazione del valore del segmento tracciato.

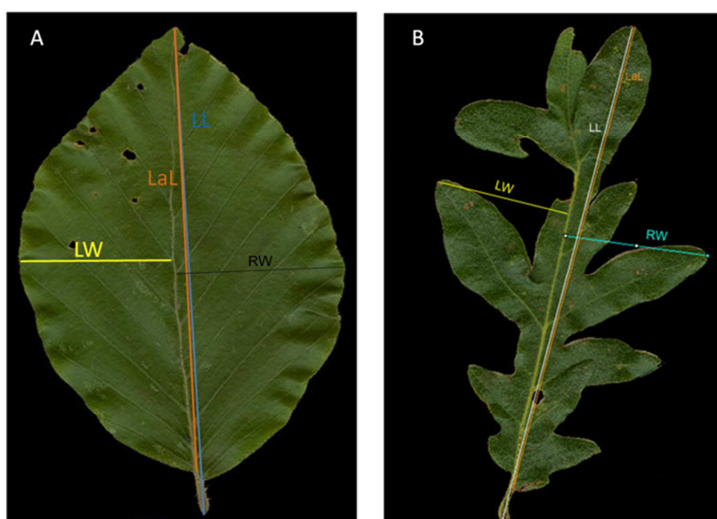


Fig. 5 – Selezione delle misure lineari in foglia di Fagus sylvatica L. (A) e Quercus cerris L. (B). LL = lunghezza della foglia; LaL = lunghezza della lamina fogliare; LW = massima larghezza della parte sinistra della lamina; RW = massima larghezza della parte destra della lamina.

Per la misura della superficie di una foglia (LA) è possibile selezionare l'oggetto da misurare (la foglia) (Figura 6) e ottenere automaticamente la misura dell'area (espressa in mm^2 o cm^2). In presenza di buchi nella lamina fogliare, causati da insetti o agenti di danno abiotico, la superficie di tali buchi viene misurata e sottratta dall'area della foglia.

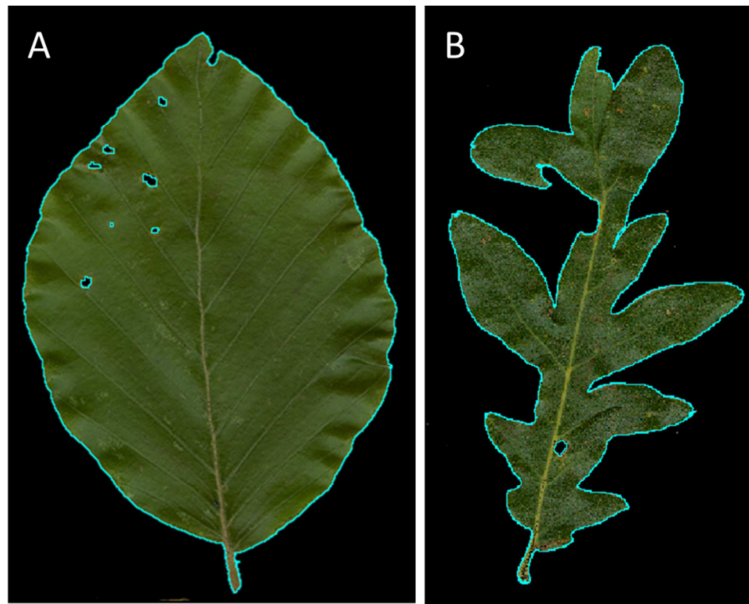


Fig. 6 – Selezione per la misura dell'area fogliare (LA) in *Fagus sylvatica* L. (A) e *Quercus cerris* L. (B).

L'asimmetria fluttuante (FA) è calcolata utilizzando le misure della larghezza massima della parte destra (RW) e sinistra (LW) della lamina (Figura 5B) applicando la seguente formula: $FA = 2 * |LW - RW| / (LW + RW)$.

La somma di LW+RW è la misura della larghezza della lamina (LaW).

Lo spessore della lamina fogliare (LT) viene misurato in tre punti casuali della lamina, evitando la nervatura principale ed eventuali grossolane alterazioni (ad es. galle, margine ripiegato). Si utilizza un calibro digitale di alta precisione (ad es. Calibro digitale Baxlo[®], modello 3000DIG). Ogni misura è annotata sulla scheda cartacea relativa alla pianta (vedi Annesso 2).

Il peso secco (DW) viene misurato utilizzando il sub-campione (i) (vedi par. 4.2) di 100 foglie e ponendo questo in stufa a 60-70°C per circa 72 h, o fino al raggiungimento di un peso costante. Si pesa il sub-campione di 100 foglie e si divide per 100, al fine di ottenere il peso medio di una foglia, espresso in milligrammi (mg); il dato si riferisce dunque alla pianta.

L'area specifica fogliare (SLA) è calcolata come rapporto tra la superficie media della foglia per albero e il peso secco di una foglia ($=LA/DW$); il valore che si ottiene si riferisce alla pianta.

5.3 Procedure di Assicurazione di Qualità (QA)

Per controllare gli errori e documentare la qualità complessiva dell'indagine è necessario adottare procedure di Quality Assurance (QA) e Quality Control (QC) (cfr. Cline and Burkman 1989, Shampine 1993, EPA 2002). Queste procedure sono parte integrante del disegno sperimentale dello studio e dei suoi risultati (cfr. Gottardini et al. 2014; Pollastrini et al. 2016a).

In questo contesto, le procedure da adottare sono essenzialmente le seguenti:

- adozione delle Procedure Operative Standard (Standard Operating Procedures, SOPs) descritte in questo manuale;
- documentazione di training del personale o uso di personale addestrato ed esperto per lo svolgimento dell'indagine;
- documentazione delle varie fasi del lavoro e tracciabilità dei dati;
- definizione di limiti e obiettivi di qualità dei dati.

6. Gestione ed analisi dei dati

I dati raccolti nelle varie fasi di lavoro necessitano di essere digitalizzati ed archiviati per garantirne la salvaguardia nel tempo e consentirne la consultazione e l'analisi.

Lo schema di archiviazione deve permettere la corretta assegnazione dei dati al campione di appartenenza e all'appropriato livello di dettaglio, e conservare il legame con le altre informazioni relative al campione stesso, e con quelle relative a tutti i livelli superiori di campionamento, localizzazione geografica e temporale. Vanno dunque preparate tante tabelle quanti sono i livelli di dettaglio dei dati raccolti. Ogni colonna di ciascuna tabella deve contenere i dati relativi ad una proprietà o misura. Per quanto riguarda i dati raccolti a livello di foglia vanno previsti specifici campi per:

- identificare univocamente il campione (codice identificativo della foglia o primary key), associarlo all'albero a cui appartiene, e localizzarlo all'interno di un sito, area geografica, distretto, regione;
- archiviare tutti i dati di misura relativi alla foglia stessa, sia in termini di contenuto di clorofilla e fluorescenza, che in termini di tratti fogliari (un esempio dei possibili campi da inserire e loro proprietà è illustrato nella tabella riportata nell'Annesso 4).

È importante sottolineare come ciascun campo debba avere un formato che rispetti il tipo di dato che verrà archiviato in esso. Esempi di formati sono: date (ggmmaaaa), text o char (con numero di caratteri $> 0 < 255$), int (n° interi), float e real (n° reale, con specificato il totale di cifre, di cui n decimali).

I dati raccolti in tabella sono in questo modo disponibili per tutte le analisi necessarie per il raggiungimento degli obiettivi delle misure, nonché per il confronto statistico con altre variabili esaminate nella medesima unità di campionamento.

Per ciascun indicatore, si calcola il valore medio per pianta e unità di campionamento (=macroplot, nel caso del progetto LIFE FutureForCoppiceS), in modo da consentire la comparazione con altre variabili relative allo stato di salute e vitalità valutate allo stesso livello di dettaglio, per un'analisi delle variazioni temporali e/o per testare gli effetti di altri fattori.

Nello specifico caso di applicazione a cui il manuale fa riferimento (progetto LIFE FutureForCoppiceS), i dati vengono utilizzati per:

- (i) verificare la relazione tra indicatori tradizionali e innovativi, per la valutazione dello stato di salute e vitalità delle foreste (Criterio 2);
- (ii) verificare le potenzialità degli indicatori tradizionali in relazione a indicatori quantitativi, misurati ed oggettivi, per una possibile interpretazione dei dati di monitoraggio in chiave di funzionalità ecofisiologica;
- (iii) dimostrare la capacità di diversi tipi di gestione del bosco nel garantirne lo stato di salute e vitalità.

7. Interpretazione dei dati

Gli indicatori proposti in questo manuale sono stati selezionati per la loro valenza nel fornire indicazioni sullo stato fisiologico e di vitalità delle piante. Essi vanno considerati ed interpretati singolarmente in relazione alla situazione indagata (ad es. specie considerata, ecosistema, fattori di stress).

Genericamente, si può ritenere che una diminuzione del contenuto di clorofilla e dei valori di F_v/F_m indichino uno stato di ridotta vitalità della pianta.

Anche le caratteristiche morfologiche della foglia possono essere influenzate da fattori di stress ambientali quali carenza idrica, elevata intensità della radiazione solare, temperature estreme. Tendenzialmente, in presenza di stress si osserva una riduzione della superficie fogliare ed un aumento dell'asimmetria della parte destra e sinistra della foglia. Foglie con maggior spessore della lamina possono invece risultare maggiormente resistenti a stress meccanici, biotici ed abiotici.

8. Bibliografia ed ulteriori letture

- Bussotti F., Bettini D., Cenni E., Ferretti M., Sarti C., Nibbi R., Capretti P., Stergulc F., Tiberi R., 2012a. Procedure di rilievo nelle aree di saggio e valutazione della condizione delle chiome. Manuale di Campagna. PARTE 2 – Valutazione della condizione delle chiome. Pubblicato da Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali, Roma.
- Bussotti F., Kalaji M.H., Desotgiu R., Pollastrini M., Łoboda T., Bosa K., 2012b. Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofilla. Firenze: Firenze university press; Strumenti per la didattica e la ricerca. Pp. 137. <http://digital.casalini.it/9788866552161>; ISBN 978-88-6655-215-4 (print); ISBN 978-88-6655-216-1 (online PDF); ISBN 978-88-6655-217-8 (online ePub).
- Bussotti F., Pollastrini M., 2015. Evaluation of leaf features in forest trees: Methods, techniques, obtainable information and limits. *Ecological Indicators*, 52: 219–230.
- Cline S.P., Burkman W.G., 1989. The role of quality assurance in ecological programs. In: Bucher J.B., Bucher-Wallin I., eds. *Air Pollution and Forest Decline*. Pp. 361-365.
- Cornelissen J.H.C., Lavorel S., Garnier E., Diaz S., Buchmann N., Gurvich D.E., Reich P.B., ter Steege H., Morgan H.D., van der Heijden M.G.A., Pausas J.G., Poorter H. 2003. A handbook of protocols for standardized and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* 51, 335-380.
- Eichhorn J., Roskams P., Ferretti M., Mues V., Szepesi A., Durrant D., 2010. Visual Assessment of Crown Condition and Damaging Agents. 49 pp. Manual Part IV. In: Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests. UNECE ICP Forests Programme Co-ordinating Centre, Hamburg. ISBN: 978-3-926301-03-1. [<http://www.icp-forests.org/Manual.htm>].
- Eichhorn J., Roskams P., 2013. Assessment of Tree Condition, in: Ferretti, M., Fischer, R. (Eds.), *Forest Monitoring. Methods for Terrestrial Investigations in Europe with an Overview of North America and Asia*. Developments in Environmental Science, Elsevier, UK, pp. 139-167.
- EPA, 2002. Guidelines for Ensuring and Maximizing the Quality, Objectivity, Utility, and Integrity, of Information Disseminated by the Environmental Protection Agency.
- Ferretti, M., Fischer, R. (Eds.), 2013. *Forest Monitoring. Methods for Terrestrial Investigations in Europe with an Overview of North America and Asia*. Developments in Environmental Science, vol. 12. Elsevier, UK, ISBN 9780080982229, 507 pp.
- Ferretti M., Cutini A., Gottardini E., 2016. Linee Guida per la preparazione coerente delle indagini e dei dati (V1 R0). Documento LIFE FutureForCoppiceS, pp.22.
- Forest Europe, UNECE, FAO, 2011. State of Europe's Forests 2011. Status and Trends in Sustainable Forest Management in Europe. <http://www.unece.org/forests/fr/outputs/soef2011.html>.
- Gottardini E., Cristofori A., Cristofolini F., Nali C., Pellegrini E., Ferretti M., 2014. Chlorophyll-related indicators are linked to visible ozone symptoms: Evidence from a field study on native *Viburnum lantana* L. plants in northern Italy. *Ecological Indicators* 39, 65– 74.
- Gottardini E., Cristofolini F., Cristofori A., Camin F., Calderisi M., Ferretti M., 2016. Consistent response of crown transparency, shoot growth and leaf traits on Norway spruce (*Picea abies* (L.) H. Karst.) trees along an elevation gradient in northern Italy. *Ecological Indicators* 60:1041–1044.

- Graham J.H., Shmuel Raz, Hel-Or Hagit, Nevo E. 2010. Fluctuating Asymmetry: Methods, theory, and applications. *Symmetry* 2, 466-540.
- Johnstone D., Moore G., Tausz M., Nicolas M., 2013. The measurement of plant vitality in landscape trees. *The International Journal of Urban Forestry*, 35:18-27.
- Kalaji, H.M., Jajoo, A., Oukarroum, A., Brestic M., Zivcak M., Samborska I.A., Cetner M.D., Łukasik I., Goltsev V., Ladle R.J. 2016. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiol Plant*, 38:102.
- Maloof J.N., Nozue K., Mumbach M.R., Palmer C.M., 2013. LeafJ: an ImageJ plugin for semi-automated leaf shape measurement. *J Vis Exp.*, 71. Article Number: UNSP e50028.
- Maxwell C., Johnson G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51, 659-668.
- Murchie E.H., Lawson T. 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany* 64, 3983-3998.
- Palmer A.R., Strobeck C. 1986. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17, 391-421.
- Papageorgiou G.C., Govindjee 2004. Chl a Fluorescence: a signature of photosynthesis, advances in photosynthesis and respiration. Springer Dordrecht, The Netherland.
- Pérez-Haruindeguy N., Diaz S., Lavorel S., Poorter H., Jaureguiberry P., Bret-Harte M.S., Cornwell W.K., et al. 2013. New handbook for standardized measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* 61, 167-234.
- Pollastrini M., Holland V., Brueggemann W., Koricheva J., Jussila I., Scherer-Lorenzen M., Berger S., Bussotti F. 2014. Interactions and competition processes among tree species in young experimental mixed forests, assessed with chlorophyll fluorescence and leaf morphology. *Plant Biology* 16, 323-331.
- Pollastrini M., Feducci M., Bonal D., Fotelli M., Gessler A., Gossiorid C., Guyot V., Jactel H., Nguyen D., Radoglou K., Bussotti F. 2016a. Physiological significance of forest tree defoliation: results from a survey in a mixed forest in Tuscany (Central Italy). *Forest Ecology and Management* 361, 170-178.
- Pollastrini M., Holland V., Brüggemann W., Bussotti F. 2016b. Chlorophyll a fluorescence analysis in forests. *Annali di Botanica* 6, 23-37.
- Pollastrini M., Garcia-Nogales A., Benavides R., Bonal D., Finer L., Fotelli M., Gessler A., Grossiord C., Radoglou K., Strasser R.J., Bussotti F. 2017. Tree diversity affects chlorophyll a fluorescence and other leaf traits of tree species in a boreal forest. *Tree Physiology*, doi:10.1093/treephys/tpw132.
- Shampine W.J., 1993. Quality assurance and quality control in monitoring programs. *Environ Monit Assess*, 26, 143-151.
- Strasser R.J., Srivastava A., Tsimilli-Michael M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus M., Pathre U., Mohanty P. (eds), *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*. Taylor and Francis, London, pp. 445-483.

9. Annessi

- **Annesso 1.** Scheda di campo.
- **Annesso 2.** Scheda misure per albero.
- **Annesso 3.** Scheda per il peso secco.
- **Annesso 4.** Esempio di lista di possibili campi con specifica del tipo di dati, dimensione, cifre decimali ed unità di misura, da utilizzare per l'archiviazione dei dati a livello di foglia.

Annesso 1. Scheda di campo



Scheda campo per Area (=Macroplot)

Data	
Regione	
Distretto	
Sito	
Area	
Macroplot	

[illegible]

Annesso 2. Scheda misure per albero



Scheda misure per albero

Data		N. Scheda	
Regione			
Distretto			
Sito			
Area			
Macroplot			
Albero			

Note:		
	Dati inseriti	file

N. foglia	Chl fluo (file n.)	Spad (valore medio)	Spessore fg 1 (mm)	Spessore fg 2 (mm)	Spessore fg 3 (mm)	Note
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						

Annexo 3. Scheda per il peso secco



Scheda campo per peso secco

Data			
Regione			
Distretto			
Albero specie		N°foglie	

[illegible]

Annesso 4. Esempio di lista di possibili campi con specifica del tipo di dati, dimensione, cifre decimali ed unità di misura, da utilizzare per l'archiviazione dei dati a livello di foglia.

Nome_campo	Data_type	Data_Size	Decimali	Unità_misura
ID_Regione	Char	255		
ID_Distretto	Char	255		
ID_Sito	Char	255		
ID_Area	Char	255		
ID_Macroplot	Char	255		
ID_Albero	Int	8		
ID_Albero_provvisorio	Int	8		
ID_Foglia	Int	8		
Sampling data	Date			gg-mm-aaaa
Participant_code	Char	255		
F _V /F _M	Real	4	2	au
F ₀	Real	4	2	au
F _M	Real	4	2	au
V _i	Real	4	2	au
V _j	Real	4	2	au
Plabs	Real	4	2	au
Chl_SPAD	Real	4	2	au
Leaf_area_LA	Real	8	2	mm ²
Leaf_thickness_LT	Real	8	2	mm
Leaf_length_LL	Real	8	2	mm
Lamina_length_LaL	Real	8	2	mm
Leaf_width_LaW	Real	8	2	mm
Max_width_left_lamina_LW	Real	8	2	mm
Max_width_right_lamina_RW	Real	8	2	mm
Fluctuating_asymmetry_FA	Real	8	2	unitless



**FutureFor
Coppices**

Shaping future forestry for sustainable coppices in southern Europe:
the legacy of past management trials



FONDAZIONE
EDMUND
MACH



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

